

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-204807

(43)Date of publication of application : 31.07.2001

(51)Int.Cl.

A61L 27/00
// C08J 9/28
C08L101:00

(21)Application number : 2000-020577

(71)Applicant : GUNZE LTD

(22)Date of filing : 28.01.2000

(72)Inventor : MORIKAWA NORIYUKI
MOROTA KATSUYASU
MORITA SHINICHIRO

(54) BASE MATERIAL FOR TISSUE CULTURE, AND BIOMEDICAL MATERIAL MADE OF SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a biomedical material having a sufficient cell density, which can be easily molded, and which has a strength to bear transplantation, and a method of manufacturing for the same.

SOLUTION: This biomedical material comprises gel comprising cells dispersed in a skeleton of sponge-like or nonwoven fabric-like molded matter of high polymer material. In this manufacturing method for the biomedical material, cell-dispersed sol is introduced into a skeleton comprising sponge-like or nonwoven fabric-like molded matter of high polymer for gelatinizing the sol.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-204807

(P2001-204807A)

(43) 公開日 平成13年7月31日 (2001.7.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード*(参考)
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	C 4 C 0 8 1
			G 4 F 0 7 4
			V
			Y
// C 0 8 J 9/28	CEZ	C 0 8 J 9/28	CEZ
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-20577(P2000-20577)

(22) 出願日 平成12年1月28日 (2000.1.28)

(71) 出願人 000001339

グンゼ株式会社

京都府綾部市青野町膳所1番地

(72) 発明者 森川 訓行

京都府綾部市井倉新町石風呂1番地 グン
ゼ株式会社研究開発部内

(72) 発明者 諸田 勝保

京都府綾部市井倉新町石風呂1番地 グン
ゼ株式会社研究開発部内

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外8名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織培養基材及びこれによる医用材料

(57) 【要約】

【課題】 十分な細胞密度を有し、成型が簡単で、しかも移植に耐えうる強度を有する医用材料およびその製造方法を提供する。

【解決手段】 スポンジ状または不織布状の高分子材料成型物からなる骨格の内部に、細胞が分散したゲルを有する医用材料；スポンジ状または不織布状の高分子材料成型物からなる骨格の内部に細胞分散ゾルを導入し、該ゾルをゲル化させることを特徴とする医用材料の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 スポンジ状または不織布状の高分子材料成型物からなる骨格の内部に、細胞が分散したゲルを有する医用材料。

【請求項2】 高分子材料成型物が生体吸収性材料である請求項1に記載の医用材料。

【請求項3】 ゲルが生体吸収性材料である請求項1に記載の医用材料。

【請求項4】 人工軟骨、人工骨、人工皮膚または人工筋肉である請求項1に記載の医用材料。

【請求項5】 スポンジ状または不織布状に成型した高分子材料成型物からなる骨格の内部に細胞分散ゾルを導入し、該ゾルをゲル化させることを特徴とする医用材料の製造方法。

【請求項6】 細胞分散ゾルがコラーゲンゾルに細胞を分散されたものであり、細胞分散ゾルのゲル化を37℃付近の温度に上昇させて行う請求項5に記載の医用材料の製造方法。

【請求項7】 細胞分散ゾルがアガロースゾルに細胞を分散されたものであり、細胞分散ゾルのゲル化を20℃付近の温度に上昇させて行う請求項5に記載の医用材料の製造方法。

【請求項8】 細胞分散ゾルがアルギン酸ゾルに細胞を分散されたものであり、細胞分散ゾルのゲル化を+2価の金属イオンを添加して行う請求項5に記載の医用材料の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、医用材料およびその製造方法に関わる。

【0002】

【従来の技術】 近年、高分子材料を足場に各種の細胞を培養する、いわゆるハイブリッド型の人工臓器の開発が進められている（細胞工学、14(12)、1995）。例えば、コラーゲンにヒト皮膚細胞を培養してなる人工皮膚などは、既に幾多の臨床実験がなされ、実用化の目処が立ちつつある（M. L. Sabolinski, et al.: Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers, Biomaterials, 17: 311-320, 1996）。

【0003】 これらハイブリッド型の人工臓器の製造に当たっては、高分子材料と細胞との複合化が問題となる。複合化の方法としては、例えば、スポンジ状に成型した高分子材料に細胞を播種し、細胞の材料への親和性を利用して接着させる方法がある。しかし、この方法の場合、細胞がスポンジ内に侵入するためにはその孔径を十分に大きくする必要がある。孔径が細胞径よりも大きくなければ細胞はスポンジ内へは侵入しえず、複合化できない。ところが、孔径を大きくすると、細胞は侵入して複合化はできる一方、高分子材料に付着しなかった細

胞は生存しえず、スポンジから脱離する。その結果、細胞はスポンジの大きな孔の高分子材料骨格部分にのみ点在する形になり、スポンジ内の細胞密度を十分に確保することが出来ない（E. Wintermantel, et al.: Tissue engineering scaffolds using superstructures, Biomaterials, 17: 83-91, 1996）。かかる複合材料では十分に人工臓器としての役割を果たしえない。

【0004】 一方、他の方法としては、ハイドロゲルを用いる方法がある。例えば、コラーゲンゾルの溶液中に細胞を懸濁させた後にゲル化させる方法などが挙げられる（榎並淳平ほか：コラーゲン・ゲル培養法（I）、組織培養、13: 26-30, 1987）。この方法の場合は、十分な細胞密度を得ることが可能である。ところが、これらのゲルは強度が低く柔軟なもののしか作製できないため、生体内に移植した場合には、圧迫や衝撃によって破損してしまうことが多く、使用可能な部位が限定される。さらに、このようなゲルは細胞の力によって収縮することが多く、所期の形の人工臓器を得ることは困難である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、十分な細胞密度を有し、成型が簡単で、しかも移植に耐えうる強度を有する医用材料およびその製造方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、十分な強度を有するスポンジ状あるいは不織布状の高分子材料成型物に、ゾルに懸濁ないし分散させた細胞を流し込み、しかる後にゲル化させることによって得られる医用材料およびその製造方法に関わるものである。

【0007】 このようにして得られた医用材料、例えば人工臓器は、スポンジ状成型物の内腔部ないし不織布状成型物の繊維の間隙にまで細胞が詰まった構造であり、ゲル中の細胞濃度を調節することにより、自由に高い細胞充填率を実現することが可能である。

【0008】 一方、ゲルの欠点であった強度の不足はスポンジ状あるいは不織布状高分子材料成型物が芯材となることによって解決される。しかも、芯材によりゲルの収縮も抑えられるため、高分子材料骨格の形を整えることにより、自由な大きさ、形状の医用材料、特に人工臓器を得ることが出来る。

【0009】 また、骨格用高分子材料に生体吸収性材料を用いることにより、生体に移植され所望の期間経過後、組織が再生された後は分解吸収され自己組織と置換される。

【0010】

【発明の実施の形態】 本発明に供する骨格用高分子材料は特に限定されないが、移植後に分解吸収されることからポリグリコール酸、ポリ乳酸（D体、L体、DL体）、ポリε-カプロラクトン、ポリ（p-ジオキサノン）（PDS）、ポリ（β-ヒドロキシ酪酸）（PHB）、ポリ酸

無水物、吸収性ポリカーボネートあるいはそれらの共重合体などが選択できる。また、形状もゾルを含浸できる構造であればよいが、スポンジ、発泡体、織布（2次元ないし3次元）、不織布（2次元ないし3次元）が挙げられる。スポンジ状を選択する場合には、細胞が侵入できるよう平均孔径 $10\mu\text{m}$ 以上、望ましくは $100\sim 300\mu\text{m}$ のものが良い。すなわち、このスポンジ状成型物に細胞を分散させたゾルを含浸させることで、スポンジの孔の表面のみならず、内腔部分にも細胞を充填させることができる。このスポンジ状成型物の製造方法は、特に制限されないが、一態様として例示すると、高分子材料の溶液を所望の型枠に入れ、凍結後、真空乾燥させることによって所望の形態のスポンジ状成型物を得ることができる。あるいは作製したスポンジを適当な形にカットすることにより成型することも可能である。

【0011】高分子材料骨格として、不織布状成型物を選択する場合には、細胞が侵入・付着できるよう、平均繊維径は $10\sim 100\mu\text{m}$ 程度、繊維間距離は $10\mu\text{m}$ 以上、望ましくは $100\sim 300\mu\text{m}$ 程度のものがよい。すなわち、この不織布状成型物に細胞を分散させたゾルを含浸させることで、不織布の各繊維の表面のみならず、繊維の間隙部分にも細胞を保持させることができる。この不織布状成型物の製造方法は、特に限定されないが、ニードルパンチ法などを選択することができ、これを適当な形状にカットしたり、縫い合わせたりすることにより所望の形状に成型することができる。

【0012】また、ゲル材料としては、細胞を生きのまま封入できるものであればよい。すなわち、温度としては 0°C 以上から 40°C 程度の範囲内でゾル-ゲル転移できるものが望ましい。また、溶媒が水であるもの、すなわちハイドロゲルを用いるのが最も望ましい。さらに、その水のpHおよび浸透圧は生理的条件、すなわちpHは中性（ $\text{pH}=7$ ）付近、浸透圧は 200 から 300mOsm であることが望ましい。以上のような細胞の生存可能な条件下で、流動性を有するゾル状態の材料に細胞を分散させる。この細胞分散液を上記の高分子材料骨格に対し、上部から滴下もしくは内部に注入することで含浸させる。次いで、高分子材料骨格内部に細胞分散ゾルが充分にかつ均一に入った後に、ゾルをゲル化させる。その結果、高分子材料骨格内がゲルで充填され、さらにそのゲル内に細胞が均一に分散した、細胞-ゲル-高分子材料骨格複合体を得ることができる。以上の条件を満たすゲル材料として、具体的にはコラーゲン、アルギン酸、アガロースなどのような天然高分子材料、ポリ（メタクリル酸-2-ヒドロキシエチル）などのような合成高分子材料が例示できる。特にコラーゲンは中性水溶液で、 4°C 付近の低温でゾル状態のものが、生体温度（ 37°C ）付近でゲル化する性質を有すること、アガロースは 20°C 付近の温度でゲル化する性質を有すること、アルギン酸は+2価の金属イオン（ Ca^{2+} 、 Mg^{2+} など）を添加するとゲル化

する性質を有すること、ならびに特にコラーゲン、アルギン酸、ポリ（メタクリル酸-2-ヒドロキシエチル）は移植後に分解吸収される性質を有することから、有効である。なお、ゲル材料としてアルギン酸またはその塩（例えばナトリウム塩）を用いた場合、ゲル化は細胞分散ゾルを高分子材料成型物からなる骨格の内部に導入した後、+2価の金属イオン（例えばカルシウムイオン）の溶液に浸漬させて行うことができる。

【0013】さらに複合化させる細胞としては、特に限定されないが、角化細胞、繊維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、筋細胞、肝細胞、脾ランゲルハンス島、脂肪細胞などが例示できる。特に機械的強度を要求される人工軟骨や人工骨を得るために軟骨細胞、骨芽細胞と組み合わせることが考えられる。また、適度な弾性や柔軟性が要求される筋組織（骨格筋、内臓筋、心筋）の再生のために、各種の筋細胞と複合化させること、また人工皮膚として角化細胞と組み合わせることが考えられる。さらに、肝臓や脾臓などのように複雑で高度な機能を有している臓器を再建するためには、肝細胞や脾ランゲルハンス島を高密度に培養する必要がある、本願発明を利用するのに適している。

【0014】

【実施例】実施例1 人工軟骨の作製

（1）スポンジ状高分子材料の作製

L-乳酸- ϵ -カプロラクトン（75:25）共重合体 2g を 100ml の1, 4-ジオキサン（和光純薬社製）に入れ、 40°C で攪拌溶解した。これをガラス製型枠に流延し、 -12°C 冷凍庫に入れ、凍結させた後、 40°C 、24時間真空凍結乾燥した。以上の操作により、平均孔径 $200\mu\text{m}$ のスポンジ状の高分子材料が得られた。

（2）軟骨細胞の採取

Lewis系4週齢雄性ラット肋骨軟骨を無菌的に採取し、付着する軟組織を可及的に除去し、取り出した軟骨組織を細片化した。次いで、酵素液〔第一液：0.25%トリプシン-EDTA（ギブコ社製）/PBS（-）（和光純薬社製）、第二液：0.1%コラゲナーゼ（和光純薬社製）/PBS（+）（ギブコ社製）〕をそれぞれ入れた試験管中にこの軟骨組織を入れ、 37°C でそれぞれ1時間、3時間振盪した。処理した軟骨組織を培養液中〔ダルベッコ改変イーグル培地（D-MEM、ギブコ社製）+10%ウシ胎児血清+ペニシリン+ストレプトマイシン+ファンギゾン〕に入れ、コンフルエント状態になるまで、約3週間、 37°C 、5% CO_2 下で培養した。次いで、0.05%トリプシン-EDTA/PBS（-）で5分間処理して、 $1,000\text{rpm}$ で5分間遠心分離し、軟骨細胞を回収した。

（3）細胞分散液の調製

細胞を分散させるためのコラーゲンゾルを調製するため、以下のA、B、Cの溶液をそれぞれ用意し、氷中で冷却した。

A. 0.15%コラーゲン溶液（滅菌済、 $\text{pH}=3.0$ 、新田ゼラ

チン社製)

B. 5倍濃度培地(D-MEMに重炭酸ナトリウムを加えないで、通常用いる際の5倍濃度の液を作り、ろ過滅菌したもの)

C. 再構成用緩衝液[100mlの0.05N水酸化ナトリウム水溶液(和光純薬社製)に対し、2.2gの重炭酸ナトリウム(ギブコ社製)、4.77gのHEPES(ギブコ社製)を溶解させ、ろ過滅菌したもの]

冷却しながら、上記A、B、C液を7:2:1の割合で、AとBをよく混合した後にCを加え、よく混合した。得られたコラーゲン混合溶液に、上記方法(2)にて採取した軟骨細胞を低温下で分散させた。

(4) 細胞の播種

上記方法(1)にて作製したスポンジ状高分子材料(直径12mm、厚さ2mm)に、上記方法(3)にて調製した軟骨細胞分散コラーゲンゾルを 1×10^5 cells/ 500μ lの濃度で播種し、4℃下で30分間放置し、スポンジ状高分子材料に軟骨細胞分散コラーゲンゾルを十分に含浸させた。次いで、37℃、5%CO₂インキュベーター内に移して2時間培養し、コラーゲンゾルをゲル化させ、軟骨細胞-ゲルースポンジ状高分子材料複合体を作製した。なお、比較例として、コラーゲンゾルを用いずに同じ濃度で軟骨細胞を培地に分散させ、軟骨細胞-スポンジ状高

分子材料複合体を作製した。

実験例1 細胞充填状態の観察

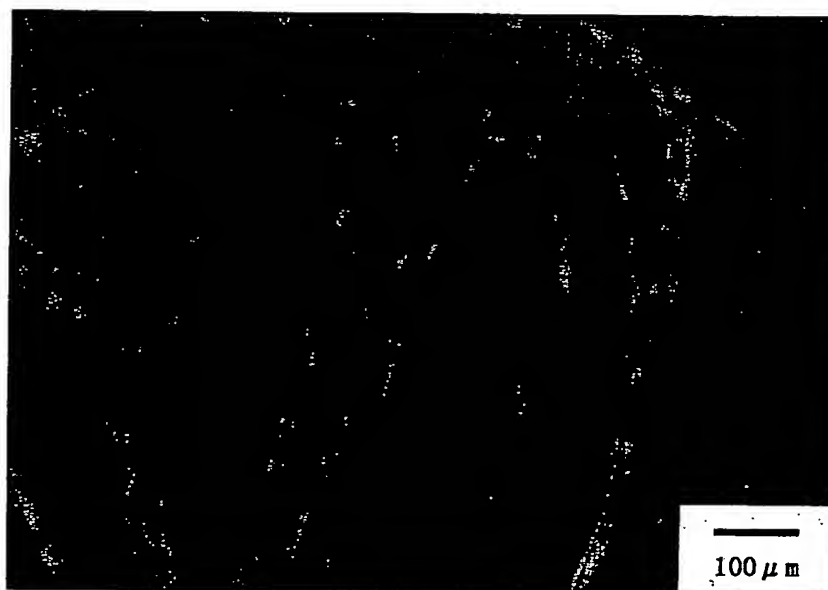
実験例1で作製した軟骨細胞-ゲルースポンジ状高分子材料複合体を37℃、5%CO₂下で、培地を1ml追加してさらに3日間培養した後、カルセインAM染色を行い、落射蛍光顕微鏡(オリンパス社製BX60、励起波長:495nm、蛍光波長:520nm)下で観察した。その結果、ゲルを用いずに作製した軟骨細胞-スポンジ状高分子材料複合体(比較例)では、カルセインAMにより緑色蛍光に染色された軟骨細胞がスポンジを構成する高分子材料骨格に沿ってのみ接着しており、内部に細胞が存在しない空隙があることが認められた(図1参照)。これに対し、軟骨細胞-ゲルースポンジ状高分子材料複合体(実施例)では、複合体内に均一に軟骨細胞が存在していることが認められた(図2参照)。

【図面の簡単な説明】

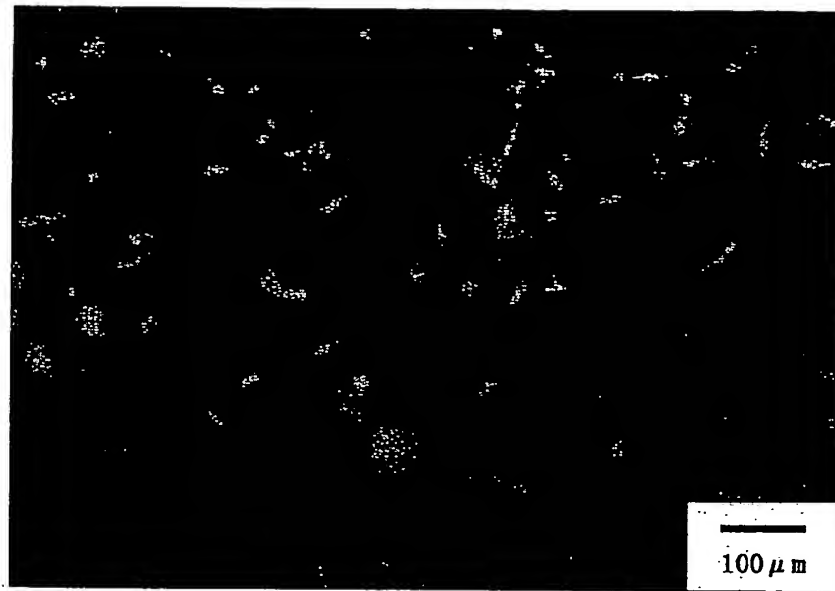
【図1】比較例として作製した軟骨細胞-スポンジ状高分子材料複合体中の軟骨細胞充填状態をカルセインAM染色で示す図面代用写真である。

【図2】実施例1で作製した軟骨細胞-ゲルースポンジ状高分子材料複合体中の軟骨細胞充填状態をカルセインAM染色で示す図面代用写真である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

C 0 8 L 101:00

識別記号

F I

C 0 8 L 101:00

ターマコード (参考)

(72) 発明者 森田 真一郎

京都府綾部市井倉新町石風呂1番地 グン
ゼ株式会社研究開発部内

F ターム (参考) 4C081 AB03 AB18 AB19 BA12 BA13

CA161 CA201 CC01 CD122

CD28 DA06 DB01 DC03 EA06

4F074 AA65 AA68 AA70 CB06 CB13

CB16 CC05X CC28Z CC29Z

DA59